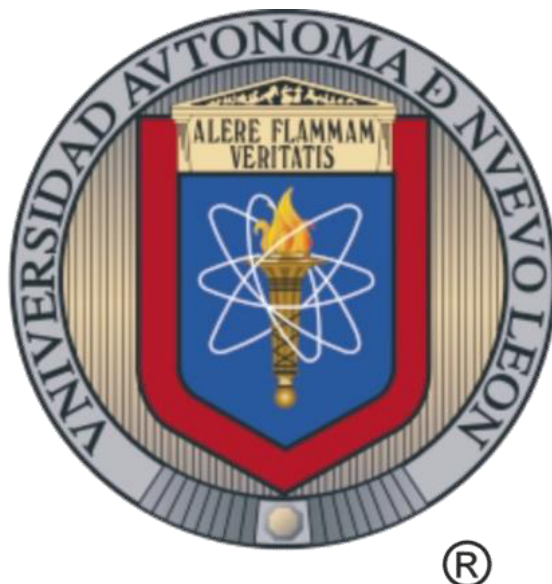


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) POR MEDIO DE
ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA**

PRESENTA

ARMANDO CÉSAR BAUTISTA CARRILLO

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

JUNIO, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) POR MEDIO DE
ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA**

PRESENTA

ARMANDO CÉSAR BAUTISTA CARRILLO

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) POR MEDIO DE
ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA**

PRESENTA

ARMANDO CÉSAR BAUTISTA CARRILLO

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Ph D. JUAN ANTONIO VIDALES CONTRERAS
DIRECTOR

Dr. JUAN FRANCISCO HERNÁNDEZ CHÁVEZ
CODIRECTOR

Dr. JOSÉ ELÍAS TREVIÑO RAMIREZ
COASESOR

Dr. HUMBERTO RODRIGUEZ FUENTES
COASESOR

Dra. ADRIANA GUTIERREZ DÍEZ
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DEDICATORIA

A Dios, creador y sustentador de todas las cosas, por permitirme concluir mis estudios en el programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola.

A mi esposa, Carmen Evangelina Martínez Caballero, por su apoyo incondicional durante estos dos años de estudio y por los cinco años juntos.

A mis hijas, Lilia Evangelina y Carmen Azucena, que quienes con su sonrisa, baba y manos pegajosas me daban su completo apoyo, tal vez, sin siquiera saberlo.

A mis padres, el Sr. Armando César Bautista Peña y la Sra. Lilia Magdalena Carrillo Loera, quienes con su incondicional apoyo durante esta etapa de mi vida, jamás me dejaron de lado, sino por el contrario, me condujeron y me guiaron en todo momento y jamás me sentí solo.

A todos mis familiares y amigos, ya que sin ellos esto no hubiese sido posible, ya que cada uno de ellos participo de una manera única e irrepetible en todo momento.

A mis compañeros y colegas con quienes compartí el privilegio de aprender día con día en este programa.

A mis maestros por todos los momentos vividos, por su tiempo, atención y conocimiento, para resolver cada duda e inquietud que tuviera.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los doctores, Juan A. Vidales Contreras, Juan Francisco. Hernández Chávez, Humberto Rodríguez Fuentes, y José E. Treviño Ramírez por formar parte del Comité de Tesis, así como por sus valiosas sugerencias de interés, en la revisión del presente trabajo.

Al personal administrativo que participo durante todo el trayecto académico que concluye a hoy, así como a los técnicos y profesionales que me asistieron en los laboratorios y campo durante la investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por hacerme acreedor de la beca para manutención durante estos dos años.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo general	3
1.1.2. Objetivos Particulares	3
1.2. Hipótesis	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Generalidades	4
4.2. Herbicidas y su impacto en el incremento de los rendimientos agrícolas	4
4.3. Efecto de la sobreutilización de herbicidas en la aparición de plantas resistentes	5
4.4. Efectos nocivos de los herbicidas	6
4.5. Generalidades del 2,4-D y su impacto	7

4.5.1.	Características fisicoquímicas del 2,4-D	7
4.5.2.	2,4-D y su efecto sobre la salud humana	8
4.5.3.	Técnicas para el análisis cuantitativo de contaminantes ambientales	9
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
5.1.	Ubicación e infraestructura utilizada durante la investigación	10
5.2.	Materiales, reactivos y equipo	10
5.2.1.	Reactivos y consumibles.....	10
5.2.2.	Equipo de electroforesis capilar	11
5.3.	Metodología	12
5.3.1.	Ensayos para la determinación de buffer y pH en la detección cualitativa de 2,4-D	12
5.3.1.1.	Selección del buffer de corrida	12
5.3.1.2.	Determinación parcial del pH para la detección 2,4-D.....	13
5.4.	Estandarización de las condiciones de corrida para la detección cuantitativa de 2,4-D.....	13
5.4.1.	Determinación de las condiciones de pH del buffer de fosfatos	13
5.4.2.	Evaluación del voltaje para las condiciones estándar de corrida.....	13
5.4.3.	Identificación del volumen de muestra para la condición estándar de ECZ	13
5.4.4.	Determinación de la presión en inyección de muestra para la condición estándar de ECZ.....	14

5.4.5. Análisis estadístico para la determinación de las condiciones estándar de ECZ	14
5.5. Análisis de muestras de agua previamente contaminadas con 2,4-D	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
6.1. Selección del buffer de corrida	16
6.2. Determinación parcial del pH para la detección 2,4-D	16
6.3. Cuantificación de 2,4-D mediante en ECZ	18
6.3.1. Determinación de las condiciones de pH del buffer de fosfatos	18
6.3.2. Evaluación del voltaje para las condiciones estándar de corrida	20
6.3.3. Identificación del volumen de muestra para la condición estándar de ECZ	20
6.3.4. Determinación de la presión de inyección de muestra para la condición estándar de ECZ	21
6.3.5. Curva estándar de la metodología propuesta	23
6.4. Análisis de muestras de agua previamente contaminadas con 2,4-D	24
5. CONCLUSIONES	27
6. RECOMENDACIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA	29
8. ANEXOS	36
8.1. Resumen presentado en el II Congreso de Investigación en Ciencia y Tecnología Agropecuaria	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Molécula 2,4-D, 2,4-D amina y 2,4-D ester.....	8
Figura 2. Imagen demostrativa del equipo P/ACE™ MDQ, Capillary Electrophoresis System Beckman Coulter.....	11
Figura 3. Secuencia de experimentos para definir las condiciones estándar para la cuantificación de 2,4-D por Electroforesis Capilar en Zona.....	15
Figura 4. Electroferograma 3D para 2,4-D utilizando Electroforesis Capilar n Zona con Buffer de Fosfatos a pH 7	18
Figura 5. Comportamiento de la variable altura con respecto a los tratamientos de pH con valor de $P < 0.01$	19
Figura 6. A) Efecto encontrado al modificar el voltaje (15 – 27.5 KV) con un valor de $P < 0.01$. B) Relación existente entre los tiempos de retención y el área obtenida ($P < 0.05$) provocado por el cambio KV	21
Figura 7. Curva estándar para la cuantificación de las condiciones definidas en el proceso de estandarización	24
Figura 8. Electroferograma típico a las condiciones establecidas en este trabajo.....	25
Figura 9. Presenta los eletroferogramas obtenidos con muestras del Río Pesquería y agua Mili Q	26

Figura 10. Resumen del trabajo presentado, en formato oral, en el marco del II Congreso de Investigación en Ciencia y Tecnología Agropecuaria, con sede en el Instituto Tecnológico Roque, Celaya, Gto del 12 – 14 mayo de 2014.....	37
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestra de Buffer (mmol L^{-1}), pH y referencias consultadas.....	12
Tabla 2. Resultados de la determinación cualitativa para la selección de Buffer y pH necesarias para la detección de 2,4-D	17
Tabla 3. Resultados para los análisis de regresión sobre la inyección de muestra....	22

RESUMEN

El herbicida 2,4-D ha sido utilizado desde los años 40's en las explotaciones agrícolas; sin embargo, este compuesto posee efectos nocivos sobre la salud humana, por esta razón, la búsqueda continua de metodologías capaces cuantificar residuos en diferentes muestras ambientales ha sido un gran campo de estudio en las últimas décadas; particularmente las técnicas de HPLC y CG han logrado esta función. Sin embargo, ambas técnicas tienen altos costos de análisis, por lo cual la Electroforesis Capilar (EC) es una opción para la cuantificación de residuos en bajas concentraciones; ya que posee un bajo costo, menor consumo de buffer y solventes, y con alta sensibilidad y reproducibilidad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue “Establecer una metodología cuantitativa basada en Electroforesis Capilar en Zona para la cuantificación ácido 2,4-diclorofoenoxiacético (2,4-D) en muestras de agua”. Para esto se utilizó un equipo Beckman Coulter P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis, utilizandó un buffer de fosfatos a pH 6.5 con 15kV y un capilar de boro-silicato con una longitud de 50 cm a la ventana de detección. El límite de detección con esta metodología fue de 9.32 mg L^{-1} , con una $R^2=0.99$. Es posible concluir que la técnica es adecuada para la cuantificación de 2,4-D; sin embargo, deben acoplarse metodologías para la concentración y extracción del 2,4-D, y así disminuir los límites de detección para el compuesto.

ABSTRACT

The herbicide 2,4-D has been used since the 40's by farmers, nevertheless this compound has adverse effects on human health. The continuing search for methods to quantify residues of 2,4-D in different environmental samples has been a great field of study in recent decades. Particularly, the HPLC and GC techniques have made this function, on the other hand, these methods have high costs. Capillary Electrophoresis (CE) is a great option for quantification wastes at low concentrations, also this technique has a low cost, lower consumption of buffer and solvents, and high sensitivity and reproducibility. The aim of this work was to "Establish a quantitative methodology based on Capillary Zone Electrophoresis for quantifying 2,4-D". For this research, it was used an equipment Beckman Coulter P / ACE MDQ capillary electrophoresis with a diode array. Also, it was used a borosilicate capillary with a length of 50 cm to window with a phosphate buffer at pH 6.5 and 15 kV for the separation. The results were a detection limit of 9.32 mg L^{-1} with an $R^2 = 0.99$. The conclusion was obtained: the technique is suitable for quantification of 2,4-D, but must engage methodologies for the extraction and concentration of 2,4-D, and thus lower detection limits for chemical compound in the environment.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de compuestos herbicidas ha llevado al hombre a incrementar los rendimientos en producción de los diversos cultivos, ya que la aplicación de estos agentes de control ha favorecido en un 90% o más al control de la maleza presente en los cultivos; ejemplo de ello son el glifosato y 2,4-D, herbicidas que lograron un control del 100% a tan solo nueve días después de su aplicación (Mamadou *et al.*, 2010). Sin embargo, algunos de estos agentes químicos poseen efectos sobre la calidad de los alimentos, ya que alteran las características fisicoquímicas y organolépticas de los mismos (Al-Waili *et al.*, 2012). Aunado a los daños directos e indirectos sobre la salud, tales como carcinogénesis, teratogénesis e incluso efectos sobre el sistema endócrino de mamíferos, incluido el hombre, y otros animales (Fu *et al.*, 2008).

Por lo anterior, los herbicidas han sido cada vez más estudiados en sus efectos sobre suelos y otros ambientes, siendo un ejemplo de esto, el estudio realizado por Lins *et al.* (2007); en el cual, la variación de artrópodos Colembolla fue observada a través del tiempo posterior a la aplicación de cuatro herbicidas diferentes, de entre los cuales 2,4-D provocó un decremento en la población de estos organismos.

Lo anterior ha favorecido la aparición de metodologías basadas en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y la Cromatografía de Gases de Alta Resolución (HPGC, por sus siglas en inglés), para la determinación de compuestos a bajas concentraciones en muestras ambientales.

Particularmente, el HPLC ha logrado, para 2,4-D, cuantificar hasta 0.006 mg L⁻¹ en muestras de suelo (Kashyap *et al.*, 2005); por su parte, Salem (2007) observó límites de detección de hasta 20 µg mL⁻¹ para ácidos clorfenoxiactéticos y carbamatos utilizando la tecnología de Cromatografía de Gases acoplado Espectrometría de Masas (GC-MS por sus siglas en ingles) para muestras de suelo y agua.

Una alternativa a estas técnicas analíticas es la Electroforesis Capilar (EC), la cual reúne las características de separación de las anteriores, con la ventaja de ser una técnica relativamente económica, con una vida media superior en los capilares, en contraste a las columnas de HPLC y HPGC, además requiere un menor volumen de solventes para la separación (Backer, 1995). La Electroforesis Capilar ha demostrado tener la capacidad de cuantificar diversos herbicidas y otras moléculas, tanto en suelo como en fluidos de mamíferos a nivel de nanogramos (Qin *et al.*, 2002; Asami e Imura, 2006; Fu *et al.*, 2008).

Con estas técnicas se ha logrado obtener modelos de transporte basados en isothermas para diferentes contaminantes herbicidas y otras moléculas orgánicas, algunos ejemplos son el 2,4-D (Bakhtiary *et al.*, 2013), Atrazina (González-Márquez y Hansen 2009), Liuron (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2003) Metil-Imazametabenz (Álvarez-Benedi *et al.*, 2007).

Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue “Establecer una metodología que permita cuantificar 2,4-D por medio de Electroforesis Capilar en Zona en muestras de agua”.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Establecer una metodología que permita cuantificar 2,4-D por medio de Electroforesis Capilar en Zona en muestras de agua.

1.1.2. Objetivos Particulares

- I. Determinar el buffer de trabajo para la detección de 2,4-D;
- II. Determinación del pH para la detección del compuesto 2,4-D;
- III. Estandarizar las condiciones de análisis para la cuantificación de 2,4-D; y
- IV. Estimar los límites de detección de la metodología establecida.

1.2. Hipótesis

La Electroforesis Capilar en Zona permitirá la detección y cuantificación de 2,4-D a bajas concentraciones en muestras de agua.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Generalidades

Los herbicidas son compuestos utilizados con el fin de controlar, disminuir o erradicar el crecimiento o proliferación de plantas no deseadas en un espacio y tiempo determinado, llamadas malas hierbas. Estas sustancias pueden ser clasificadas por su función, modo de acción, momento de aplicación o constitución química (Rosales-Robles y Sanchez-de la Cruz, 2006).

Particularmente, la clasificación por constitución o familia química, nos permite conocer su modo de acción, ya que poseen características muy parecidas entre sí; algunos ejemplos son: fenoxiacéticos, triazínicos, sulfonilureas y, bipiridilos, entre otros (Esqueda-Esquivel y Tosquy-Valle, 2006).

4.2. Herbicidas y su impacto en el incremento de los rendimientos agrícolas

La aplicación de herbicidas ha favorecido el incremento en la productividad de los cultivos a nivel mundial, ya que al controlar las malezas reducen la competencia por luz, agua y nutrientes, evitando la reducción en la producción; tal es el caso ocurrido en Chile, donde la avenilla (*Avena fatua* L.) provoca pérdidas cercanas o superiores al 90% en el cultivo de trigo, cuando esta iguala o supera las 11 plantas m⁻² (Ormeño, 1992); por lo cual, existe una búsqueda constante para identificar el Periodo Crítico de Competencia (PCC) de la malas hierbas y de este modo reducir las pérdidas económicas en los cultivares; Anwar *et al.* (2012), determinó el rango de 7 - 49 días

después de la siembra como PCC en arroz, logrando una disminución del 95% en las pérdidas del cultivo, por mencionar un ejemplo. Además, existen casos de incrementos cercanos al 300% al realizar buenas prácticas del control de malezas, como ha sido logrado en el cultivo de soya (Esqueda-Esquivel y Tosquy-Valle, 2006).

4.3. Efecto de la sobreutilización de herbicidas en la aparición de plantas resistentes

A pesar de lo antes mencionado, la capacidad de adaptación de los organismos a los ambientes hostiles provocados por la aplicación de herbicidas ha facilitado el desarrollo de especies resistentes a diversos compuestos, por ejemplo, *Raphanus raphanistrum* en Australia que posee resistencia al ingrediente 2,4-D (Walsh *et al.*, 2008), agregando también a *Lolium multiflorum* (Griffin *et al.*, 2004) y *Conyza sumatrensis*, ambas con resistencia al Paraquat (Chiang *et al.*, 2008). Esto confirma lo mencionado por Beckie y Tardif (2012) quienes mencionan un incremento en malezas con resistencia a herbicidas principalmente de las familias Asteraceas, Amarantaceas y Poaceas.

Bajo este escenario, los agricultores han buscado una solución basada en el aumento de las dosis de aplicación por hectárea y el uso de combinaciones de agentes químicos para el control eficiente de malezas. Este es el caso de Xica, Veracruz, donde el 2,4-D + Picloram es la principal combinación herbicidas para el control de malas hierbas en pastizales. Sin embargo, esta mezcla presenta una baja eficiencia para eliminar *Solanum diversifolium*, ya que requiere un periodo mínimo de 90 días, después de la aplicación (DDA), para alcanzar 90% de control, mientras que para *Mimosa albida* Willd, este índice de eliminación es inferior al 67.5% a los 90

DDA (Esqueda-Esquivel y Tosquy-Valle, 2006). No obstante, lo anterior, en Veracruz el 34% de los ganaderos usan 2,4-D + Picloram para el control de malezas (Martínez y Cruz, 2009).

Estas aplicaciones extensivas de herbicidas han favorecido su acumulación en ambientes acuáticos y edáficos de México como es el caso del Distrito de Riego 063 que presenta concentraciones trazas de agentes triazínicos, fenoxiclorados (como 2,4-D) y organoclorados en aguas y sedimentos (Hernández-Antonio y Hansen, 2011).

4.4. Efectos nocivos de los herbicidas

Los herbicidas pueden permanecer en contacto con el hombre de diversas formas, algunas de ellas ocurren por el consumo involuntario de estos productos a través de los alimentos, tal como lo menciona Al-Waili *et al.* (2012), no dejando de lado el contacto directo por su aplicación para el control de malezas. Estos compuestos al ser mal utilizados pueden favorecer la aparición de síntomas como náuseas, vomito, y dolor abdominal, así como problemas neurodegenerativos, cáncer, he incluso la muerte del 5% de los individuos con intoxicación grave en las primeras 24 a 48 horas. Nakbi *et al.* (2010a) realizó una revisión sobre los diversos contaminantes en productos apícolas, entre los cuales destacan plaguicidas y herbicidas diversos, agregando a esto lo encontrado en el Departamento de Emergencia del Hospital del Oeste de China en junio del 2010, donde fueron atendidos pacientes con síntomas de intoxicación por Paraquat, que registraron una mortalidad del 48.24% en los dos días posteriores a su ingreso al nosocomio (Shi *et al.*, 2012).

4.5. Generalidades del 2,4-D y su impacto

4.5.1. Características fisicoquímicas del 2,4-D

El herbicida 2,4-D (Figura 1) pertenece a la familia química de los fenoxiclorados o fenoxiacéticos, compuestos agroquímicos más ampliamente utilizados en la industria agrícola para el control de plantas de hoja ancha (Rosales-Robles y Sanchez-de la Cruz, 2006). Este ingrediente es un compuesto que actúa de forma selectiva en plantas dicotiledóneas; fue descubierto en los años 40's y su modo de acción es similar al comportamiento de las hormonas auxinas en las plantas. Al igual que el resto de los compuestos fenoxiacéticos, presenta un anillo de benceno, mismo al que se encuentran adheridos dos iones de cloro en las posiciones dos y cuatro (Kobylecka *et al.*, 2009).

Aunado a lo anterior, el ingrediente 2,4-D ha presentado baja adhesión al suelo, esto debido a su bajo coeficiente agua-octanol ($K_{oc} = 60$), favoreciendo con esto su constante aparición en aguas subterráneas (Farenhorst y Prokopowich, 2003), sin embargo, existen otros parámetros o indicadores de adsorción del 2,4-D el suelo, como pueden ser el contenido de arcillas, materia orgánica y el pH (Rodríguez-Rubio *et al.*, 2006).

Comercialmente el compuesto 2,4-D puede ser encontrado con sales aminas, sódicas y amónicas, favoreciendo su disociación en agua; dando mayor estabilidad y evitando el daño a los cultivos de interés. Opuestamente, cuando la molécula presenta en su formulación ésteres, disminuye su solubilidad en agua y favorece la volatilidad del compuesto, disminuyendo también su reacción con sales en aguas

duras; causando problemas de fitotoxicidad en los cultivos de interés (Tarragó *et al.*, 2005).

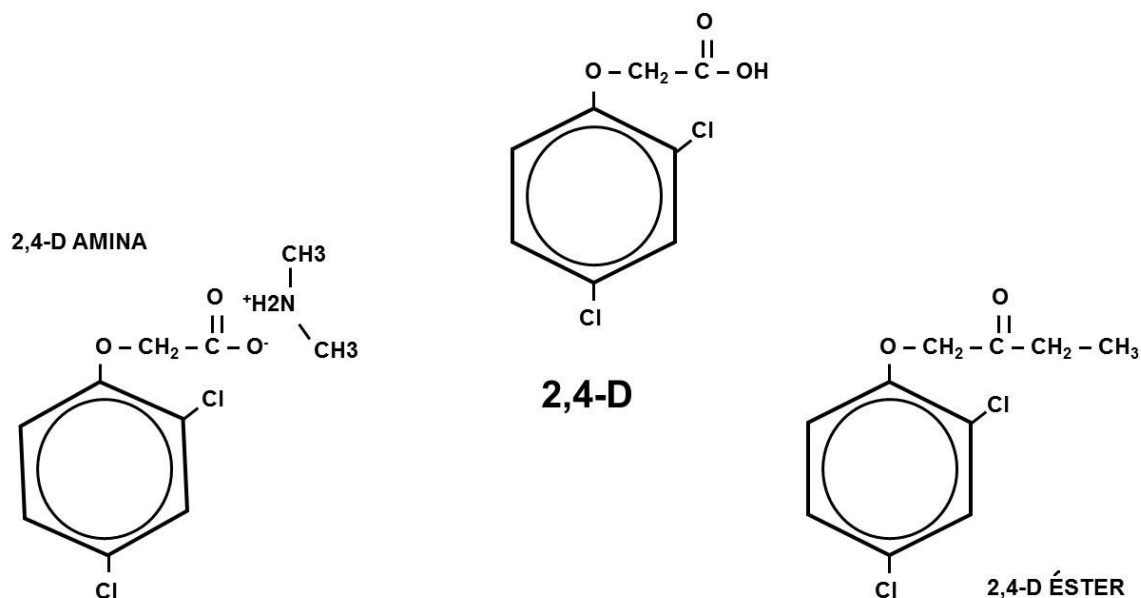


Figura 1. Molécula de 2,4-D, 2,4-D amino y 2,4-D éster.

4.5.2. 2,4-D y su efecto sobre la salud humana

La acumulación de estos plaguicidas es de gran preocupación, ya que se han encontrado trazas de 2,4-D en familias rurales de los estados de Minesota y California del Sur en Estado Unidos de América, que van desde los 0.5 hasta 2.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ en orina, antes de la aplicación del agroquímico (Alexander, *et al.*, 2007). Fisiológicamente, estos químicos aumentan la oxidación de los ácidos grasos (Nakbi, *et al.*, 2010a) además de afectar las células hepáticas (Nakbi, *et al.*, 2010b) y de estar asociados a enfermedades tales como el Linfoma No-Hodgkin y Parkinson,

además el herbicida glifosato ha sido asociado por lo menos a diez tipos de cáncer, esto según la revisión realizada por De Roos *et al.* (2005).

4.5.3. Técnicas para el análisis cuantitativo de contaminantes ambientales

Las técnicas utilizadas en la detección de herbicidas en suelo y agua así como en fluidos corporales se encuentra la Cromatografía de Líquidos y Gases de Alta Resolución (HPLC y HPGC, por su siglas en Ingles, respectivamente); sin embargo, una técnica emergente es la Electroforesis Capilar (EC) que reúne las características de separación de las anteriores pero con la ventaja de ser una técnica relativamente económica, los capilares utilizados son de mayor vida útil y requiere pequeños volúmenes de muestra con un bajo consumo de reactivos (Baker, 1995). Es importante señalar que esta técnica ha demostrado tener la capacidad de cuantificar diversos herbicidas y otras moléculas tanto en suelo, como en fluidos de mamíferos a nivel de nanogramos (Qin, *et al.*, 2002; Asami e Imura, 2006; Liu, *et al.*, 2006; Xu, *et al.*, 2008; Fu, *et al.* 2008; Lanaro, *et al.*, 2011). Diversos investigadores han evaluado su capacidad de cuantificación en muestras de origen diverso; entre ellos, Lanaro *et al.* (2011), encontró como límite de detección en orina 22 ng ml⁻¹ para Paraquat, por su parte, Fu *et al.* (2008), concluyó que la técnica de EC es adecuada para la determinación de 2,4-D en suelo. De hecho, Liu, *et al.* (2006) observó que la EC es una técnica eficiente para la detección de fenoxiclorados, e incluso con mayor resolución que HPLC y HPCG.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación e infraestructura utilizada durante la investigación

La estandarización de la técnica de Electroforesis Capilar en Zona (ECZ) fue llevada a cabo en el Laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Aguas, Suelos y Plantas de la Facultad de Agronomía en la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en el Campus de Ciencias Agropecuarias en General Escobedo, Nuevo León y en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Aguas y Plantas de la misma Facultad, ubicado en el campus Marín, en el municipio de Marín, Nuevo León.

Las muestras de aguas para la valoración de la metodología propuesta fueron tomadas a partir de agua embotellada (Epura) para consumo humano y agua del Río Pesquería (RH 24BC). El cual es una subcuenca que pertenece a la región hidrológica de Bravo-Conchos cuenca Río Bravo–San Juan (INEGI, 2009). El caudal del citado río nace en el municipio de García, Nuevo León y es uno de los principales tributarios del Río San Juan (INEGI, 1986).

5.2. Materiales, reactivos y equipo

5.2.1. Reactivos y consumibles

Todos los reactivos utilizados para la preparación de buffer y soluciones de trabajo utilizadas en este trabajo son grado HPLC, mientras que el agua utilizada es grado Mili Q y la molécula estándar fue 2,4-D (SIGMA-ALDRICH), con 99.8% de pureza.

5.2.2. Equipo de electroforesis capilar

El equipo de electroforesis capilar utilizado para este trabajo fue un P/ACE™ MDQ, Capillary Electrophoresis System, Beckman Coulter (Figura 2) con un detector de arreglo de diodos, utilizando un capilar de la compañía BeckmanCoulter modelo Capillary Tubing fabricado en sílice fundido con un diámetro interno de 50 μm y un diámetro externo de 375 μm , además tolera un rango de temperatura, para trabajo, desde los 18 hasta 30°C; la longitud total del capilar es de 62 cm, con un largo a la ventana de lectura de 50 cm.



Figura 2. Imagen demostrativa del equipo P/ACE™ MDQ, Capillary Electrophoresis System, Beckman Coulter.

5.3. Metodología

5.3.1. Ensayos para la determinación de buffer y pH en la detección cualitativa de 2,4-D

5.3.1.1. Selección del buffer de corrida

Se evaluaron diversos buffers (Tabla 1) reportados en la literatura (Forray y Hallbauer, 2000; Lucio *et al.*, 2006; Scrano *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2011) tomando en cuenta, como principal variable para la selección, la estabilidad de corriente dentro del sistema y la aparición de un pico emitido por la lectura del compuesto 2,4-D entre los 200 y 230 nm de absorvancia. Esta fase experimental no utilizó ningún análisis estadístico, por lo cual solo se tomó como adecuado aquel buffer que presentara reproducibilidad (n=5) para las lecturas del compuesto y estabilidad de corriente.

Tabla 1. Buffers (mmol L⁻¹) y pH utilizados por otros estudios para la cuantificación de 2,4-D.

Buffer	[mmol L ⁻¹]	Ph	Referencia
Acetato/Acético	30	4.5	Scrano <i>et al.</i> (2006); Lucio <i>et al.</i> (2006); Fu <i>et al.</i> (2008); Fonseca <i>et al.</i> (2011)
	50	4.2	
Acetato	30	7	
	50	7.2	
Borato-Acético	30	8.2	
	50	9	
Borato	30	9.2	Propuesta en este trabajo
	50	9.2	
Fosfatos	20	9.1	Forray y Hallbauer (2000); Fu <i>et al.</i> (2008)
		8.2	
		7	

5.3.1.2. Determinación parcial del pH para la detección 2,4-D

Para la determinación del pH en el buffer de corrida se probaron tres niveles diferentes, 9.1, 8.2 y 7, la variable a observar fue estabilidad de corriente, tiempo de migración y la absorbancia del pico a los 200 nm utilizando 20 kV de voltaje, 7.5 µl de muestra y 10 s de tiempo de inyección a 0.5 psi de presión en la inyección.

5.4. Estandarización de las condiciones de corrida para la detección cuantitativa de 2,4-D

5.4.1. Determinación de las condiciones de pH del buffer de fosfatos

La determinación de pH se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: buffer de fosfatos a 20 mmol, con un rango de pH de 6.0 a 7.5, a un intervalo de 0.5 pH entre cada tratamiento, utilizando sin variación en el experimento 25 KV de corriente aplicada al medio, con un volumen de muestra de 5 µL e inyección hidrodinámica por 15 seg a 1 psi de presión.

5.4.2. Evaluación del voltaje para las condiciones estándar de corrida

El voltaje fue evaluado a partir de un rango de 15 a 27.5 kV con intervalo de 2.5 kV por tratamiento, dando un total de seis tratamientos, utilizando de forma constante las siguientes condiciones: buffer de fosfatos 20 mmol a 6.5 pH, con un volumen de muestra de 5 µL e inyección hidrodinámica por 15 seg a 1 psi de presión.

5.4.3. Identificación del volumen de muestra para la condición estándar de ECZ

El volumen de muestra fue definido midiendo los cambios en área y altura de pico del electroferograma observado, utilizando 5 tratamientos (1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 µL

de muestra) con tres repeticiones por medio de un análisis de varianza en un diseño completamente al azar con un valor de $P \leq 0.05$, manteniendo constantes las siguientes condiciones: buffer de fosfatos 20 mmol a 6.5 pH aplicando 15 kV al medio y 1 psi en la inyección de muestra durante 15 seg.

5.4.4. Determinación de la presión en inyección de muestra para la condición estándar de ECZ

Las condiciones de presión para la inyección de muestra fueron determinadas a partir de tres tratamientos, utilizando 0.3, 0.5 y 1.0 psi de presión, manteniendo constantes el resto de las variables previamente probadas. Las condiciones de trabajo fueron buffer de fosfatos 20 mmol a 6.5 pH aplicando 15 kV con un tiempo de inyección de 15 seg y un volumen de muestra 5.0 μL .

5.4.5. Análisis estadístico para la determinación de las condiciones estándar de ECZ

Los análisis estadísticos de los experimentos antes mencionados, fueron realizados en el paquete estadístico SPSS versión 20.0, utilizando un modelo “Completamente al Azar”, además para cada experimento se evaluó la relación entre las variables y la fuente de variación del experimento, para determinar si fuese o no necesario incluir un número mayor de tratamientos para cada ensayo. La comparación de medias se hizo por Tukey, cuando existieron diferencias significativas en el experimento.

La secuencia de experimentos para la estandarización se encuentra resumida en la Figura 3, donde se puede observar el orden de los experimentos, variable

modificada para cada tratamiento y las variables que se mantuvieron constantes durante el estudio.

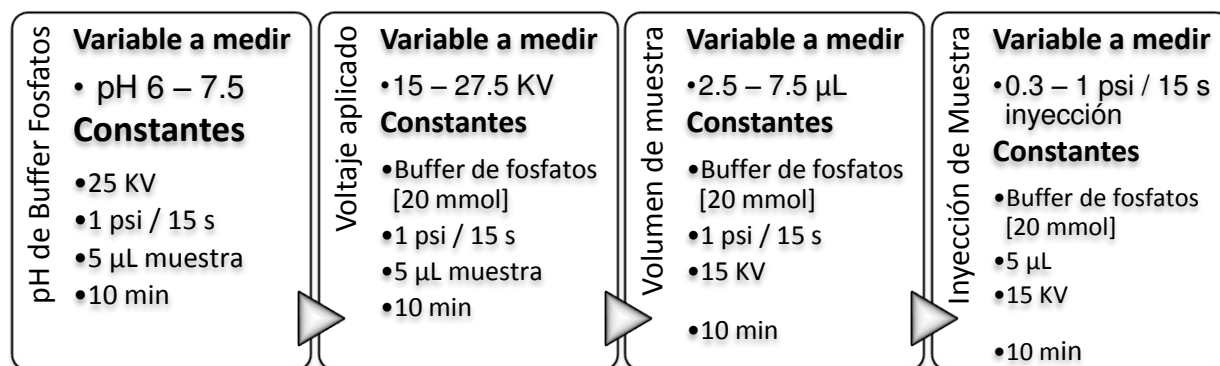


Figura 3. Secuencia de experimentos (izquierda a derecha) para definir las condiciones estándar para la cuantificación de 2,4-D por ECZ.

5.5. Análisis de muestras de agua previamente contaminadas con 2,4-D

El análisis con muestras de agua fue llevado a cabo con agua proveniente del Río Pesquería y agua para consumo humano de la marca Epura. Ambas muestras fueron contaminadas con una dilución 1:10 de la solución madre de 2,4-D (0.932 mg mL^{-1}) y se realizó el análisis con la muestra contaminada artificialmente y sin contaminar. Para este análisis las muestras fueron filtradas con papel Watman N° 1 utilizando una jeringa de 3 cm^3 como columna, dejando pasar un volumen de 5 mL de muestra libremente a través del filtro, finalmente se recuperó un mililitro de producto filtrado y se sometió a la metodología para Electroforesis Capilar en Zona establecida en este trabajo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Selección del buffer de corrida

Los resultados (Tabla 2) obtenidos en las pruebas para la selección del buffer fueron opuestos a los reportados en la literatura, ya que el buffer mayormente utilizado, para la separación de productos herbicida es Acetato/Acético, sin embargo, bajo las condiciones propias del Laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Aguas, Suelos y Plantas, este buffer no presentó estabilidad en la corriente como lo mencionan diversos autores, tales como Fonseca *et al.* (2011), Fu *et al.* (2008), Lucio y Schmitt-Koplinn (2006) y Scrano *et al.* (2006). Por su parte, Fu *et al.* (2008) mencionó que los buffers de fosfato y borato, no fueron adecuados para la separación eficiente de los herbicidas, ácido 2-metil-4-cloro-fenoxiacético (MCPA) y 2,4-D, ya que estos compuestos presentaron una sola lectura al realizar la metodología para la detección simultanea de ambos compuestos fenoxiclorados. Por lo anterior se decidió probar ambos buffers, ya que los compuestos utilizados para este trabajo no pertenecen a la misma familia química, como en el caso antes mencionado. Finalmente, solo el buffer fosfatos fue capaz de proporcionar estabilidad en la corriente y una lectura clara de la absorbancia de 2,4-D, con máximos en 200 y 230 nm (Andino et al., 2010), a pH's de 9.1, 8.2 y 7 (Figura 4).

6.2. Determinación parcial del pH para la detección 2,4-D

Los pH probados en esta sección fueron 9.1, 8.2 y 7, se prosiguió a evaluar el comportamiento del herbicida 2,4-D, dando como resultado un electroferograma

mayormente definido a pH de 7. El buffer a pH neutro presento mayor estabilidad en la corriente eléctrica del sistema.

Tabla 2. Resultados de la determinación cualitativa para la selección de Buffer y pH necesarios para la detección de 2,4-D

Buffer	[mmol L ⁻¹]	pH	Resultados	
			Respuesta en corriente	Lectura Electroferograma
Acetato/Acético	30	4.5	–	–
	50	4.2	–	–
Acetato	30	7	–	–
	50	7.2	–	–
Borato-Acético	30	8.2	–	–
	50	9	–	–
Borato	30	9.2	–	–
	50	9.2	–	–
Fosfatos	20	9.1	+	+
		8.2	+	+
		7	+	+

Adecuado (+); Inadecuado (-)

Los resultados encontrados no coinciden con la literatura previamente reportada, tal es el caso de Scrano *et al.* (2006) quien reporta un pH 3.6 utilizando 25.5 kV para oxasulfuron, obteniendo, con dichas condiciones, un tiempo de migración cercano a los 15 minutos. Los resultados reportados por Fu *et al.* (2008) fueron contrastantes de los observados en el presente estudio, ya que ellos obtienen un tiempo de migración de casi 16 minutos con buffer de acetato/acético a 30 mmol en un pH de 4.3 para el herbicida 2,4-D. Los resultados presentados por Song y Budde (1996) para los compuestos Paraquat y Diquat se oponen a nuestros resultados, ya que

ellos utilizan un pH de 3.9 con buffer de ácido acético obteniendo un tiempo de migración cercano a los 10 minutos.

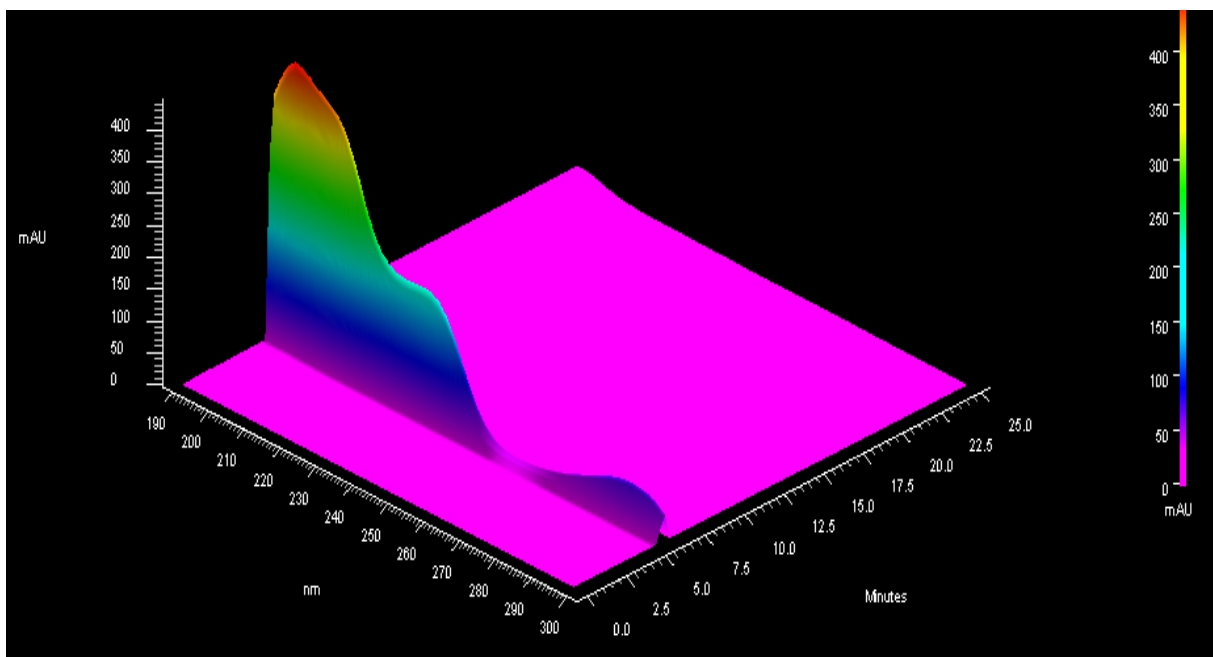


Figura 4. Electroferograma en tres dimensiones para 2,4-D utilizando Electroforesis Capilar en Zona con buffer de fosfatos a pH 7.

6.3. Cuantificación de 2,4-D mediante en ECZ

6.3.1. Determinación de las condiciones de pH del buffer de fosfatos

Existió diferencia significativa entre los tratamientos de pH (6.0, 6.5, 7.0 y 7.5) para las tres variables (tiempo de retención, área y altura), siendo el tratamiento con pH de 6.5 el mejor de ellos, ya que presentó mayor área y altura de pico con respecto al resto de los tratamientos, no siendo así para la variable tiempo de retención, donde fue igual que los tratamientos con pH de 7.0 y 7.5, pero superior al tratamiento con pH de 6.0. Estos resultados no concuerdan con los reportados por Kruaysawat *et al.*

(2001) quien observó un tiempo de retención superior a pH's cercanos 4. La diferencia en la tendencia encontrada en nuestro trabajo puede ser explicada en el uso de buffer fosfatos, ya que utiliza un buffer de acetato de sodio, mismo que es citado por otros autores para la separación de compuestos químicos utilizados como herbicidas (Fu et al., 2009; Lucio y Schmitt-Kopplin, 2006); sin embargo, coincide en que existe una tendencia a mejorar la altura y área del pico al disminuir la acides del buffer de trabajo, como se muestra en la Figura 5.

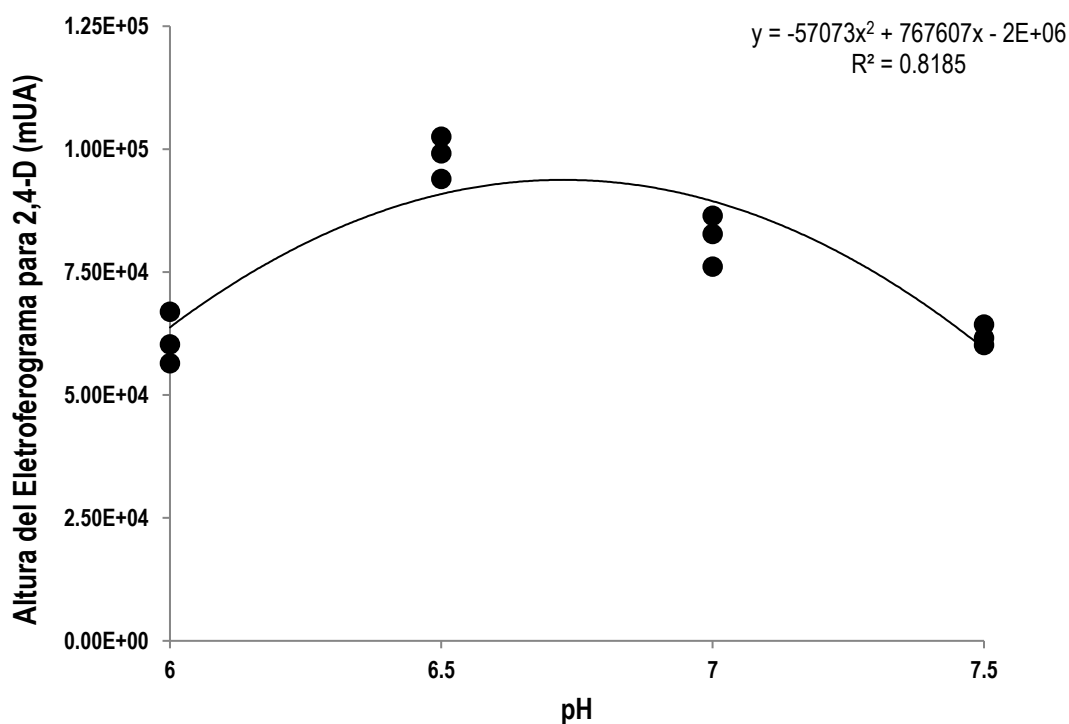


Figura 5. Comportamiento de la variable altura con respecto a los tratamientos de pH con valor de significancia de $P \leq 0.01$.

6.3.2. Evaluación del voltaje para las condiciones estándar de corrida

La evaluación del voltaje aplicado mostró diferencias significativas entre los tratamientos (15 – 27.5 KV con intervalos de 2.5), siendo el tratamiento con 15 KV el mejor de todos al obtener la mayor área y altura de pico de absorbancia, presentando además, un mayor tiempo de retención y mayor reproducibilidad que el resto de los tratamientos. Por su parte, la Figura 6a, muestra un claro efecto lineal sobre la migración del compuesto 2,4-D, con un decremento en el tiempo de migración al aumentar el voltaje aplicado, sumando a esto una disminución en la altura y área del pico (Figura 6b); esto difiere con lo dicho por Fu *et al.* (2008) quién encontró mayor reproducibilidad y eficiencia a 20 kV aplicados al medio con un buffer de acetatos y ácido acético, utilizando un rango de voltaje de 15 a 25 kV.

6.3.3. Identificación del volumen de muestra para la condición estándar de ECZ

La determinación del volumen de muestra solo presentó diferencias significativas para la variable área, en la cual, el tratamiento con 5 μ L para volumen de muestra fue superior a los tratamientos de 2.5 y 7.5 μ L, conjuntamente y de forma generalizada, el tratamiento con 5 μ L de volumen se expresó con una media superior a los dos tratamientos restantes para todas las variables observadas.

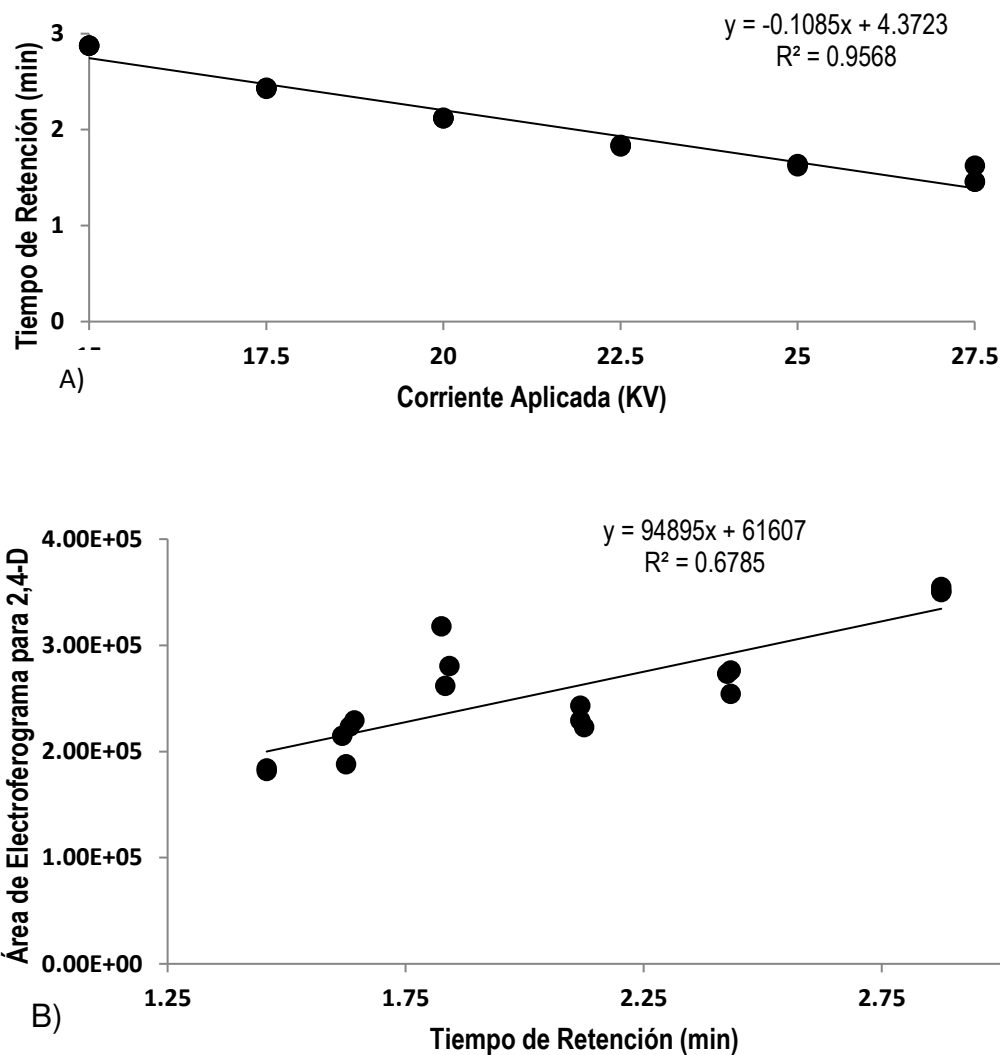


Figura 6. A) El efecto observado al modificar el voltaje (15 – 27.5 KV) con un valor de significancia de $P \leq 0.01$. B) La relación entre los tiempos de retención y el área obtenida ($P \leq 0.05$), por el cambio de corriente aplicado (KV).

6.3.4. Determinación de la presión de inyección de muestra para la condición estándar de ECZ

Los resultados encontrados en esta sección, muestran diferencias significativas a un valor $P \leq 0.01$ para todas las variables en estudio, siendo el tratamiento con 1 psi el mejor de los tres tratamientos (0.3, 0.5 y 1 psi), este resultado se opone a lo

mostrado por Fonseca *et al.* (2011), quien utilizó 0.3 psi para la inyección de compuestos hormonales sintéticos, que coincide en lo observado por Qin *et al.* (2002). Sin embargo nuestros resultados son semejantes a lo presentado por Lanaro *et al.* (2011), quien utiliza 0.7 psi para la inyección hidrodinámica de muestras de herbicidas fenoxiacéticos. Es importante mencionar que se observó un incremento lineal en el tiempo de retención, simultaneo al incremento en la presión de inyección de la muestra, ocurriendo del mismo modo para las variables de área y altura, todos con valores de $R^2 \geq 0.98$. Así mismo, se encontró una relación positiva entre los valores de altura y área con respecto al tiempo de retención, mismos que presentaron valores de $R^2 = 0.9451$ y $R^2 = 0.9819$, respectivamente, el valor de significancia fue superior $P \leq 0.01$ para los análisis de regresión realizados en este apartado del trabajo. Los resultados para los análisis de regresión se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados para los análisis de regresión sobre la inyección de muestra.

Eje X	Eje Y	Ecuación	R^2
TR (min)	Presión (psi)	$y = 2.1512x + 2.2269$	$0.9845^{*\circ\dagger}$
Área		$y = 366257x + 21184$	$0.9811^{*\circ}$
Altura		$y = 101530x - 9008.6$	$0.9977^{*\circ\dagger}$
Área	TR (min)	$y = 165808x - 342301$	$0.9451^{*\circ\dagger}$
Altura		$y = 46458x - 111509$	$0.9819^{*\circ\dagger}$

* $P \leq 0.01$ para la F del análisis de varianza; ° $P \leq 0.01$ para la prueba de T sobre β ; † $P \leq 0.01$ para la prueba de T sobre la constante

6.3.5. Curva estándar de la metodología propuesta

La curva estándar (Figura 7) con una $R^2=0.99$, mostrando además un valor $P \leq 0.01$ en el análisis de varianza para regresión lineal simple, lo cual nos permite calcular la concentración de una muestra ambiental con gran exactitud.

Las condiciones estándar para la cuantificación de 2,4-D presentadas en este trabajo no coinciden con la literatura previamente reportada; particularmente, el tiempo de migración encontrado fue de 4.4 min, utilizando un pH de 6.5 con una carga de 15 kV, diferente a los resultados observados por Scrano *et al.* (2006) quien utilizó un pH 3.6 con una carga 25.5 kV para oxasulfuron para un tiempo de migración cercano a los 15 minutos. Los resultados mostrados por Fu *et al.* (2008) son contrastantes de los aquí reportados, ya que ellos obtienen un tiempo de migración de casi 16 minutos con buffer de acetato/acético a 30 mmol con un pH 4.3 para el herbicida 2,4-D; por otra parte, los resultados presentados por Song y Budde (1996) para los compuestos Paraquat y Diquat son contrastantes, ya que en su estudio, utilizaron un pH de 3.9 con buffer de ácido acético obteniendo un tiempo de migración cercano a los 10 minutos.

Por otra parte, los límites de detección obtenidos en este trabajo (9.32 mg L^{-1}) son mayores a los obtenidos Lanaro *et al.* (2011), quien obtuvo 0.5 mg L^{-1} para plasma sanguíneo y orina en la molécula Paraquat; también destaca lo reportado por Qin *et al.* (2002) quien obtuvo un límite de detección para 2,4-D de 0.009 mg L^{-1} utilizando buffer de acetato/ácido acético, aplicando un tratamiento de extracción y concentración del compuesto herbicida. Más recientemente, Fonseca *et al.* (2011)

obtuvo límites de detección 3.16 mg L^{-1} en muestras de agua contaminadas con moléculas estrogénicas.

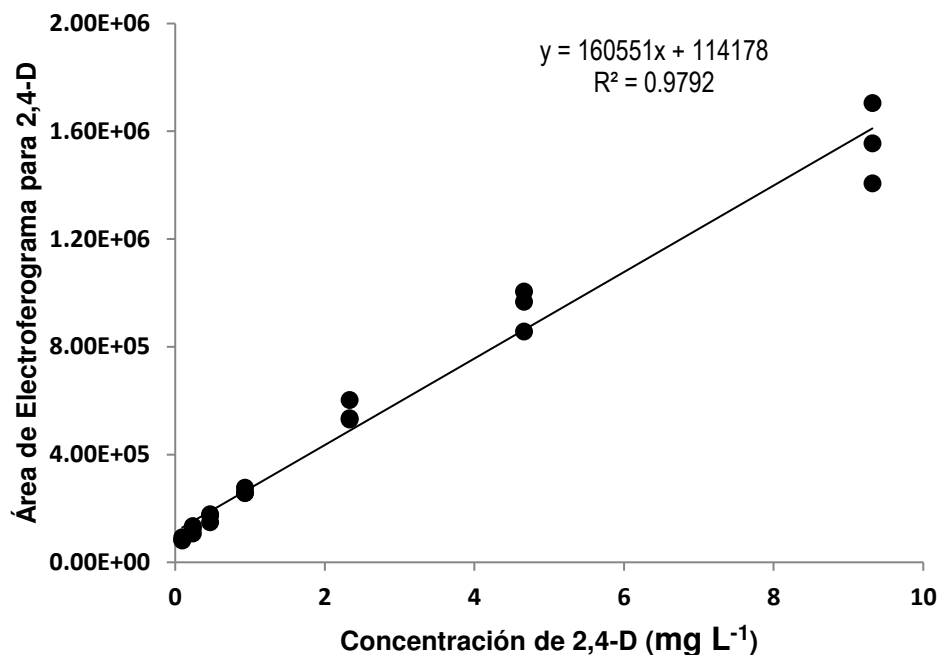


Figura 7. La curva estándar para la cuantificación de 2,4-D utilizando las condiciones de cuantificación definidas en el proceso de estandarización (20 mmol de buffer de fosfatos, pH 6.5, 15 kV, 1 psi) utilizando 5 μL de muestra.

6.4. Análisis de muestras de agua previamente contaminadas con 2,4-D

Se realizó una evaluación parcial de la metodología utilizando agua comercial para consumo humano y agua del Río Pesquería, con la finalidad de encontrar alteración sobre la línea base del electroferograma típico, para las condiciones establecidas en este trabajo (Figura 8), que pudiesen disminuir la eficiencia de la técnica al momento de ser sometidas para realizar un análisis ambiental.

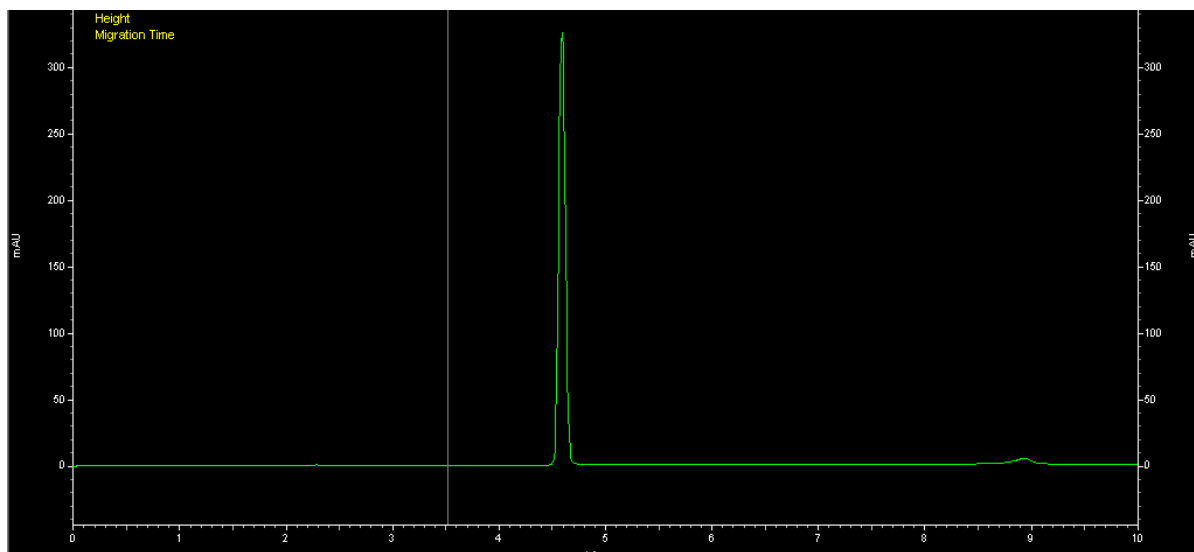


Figura 8. Electroferograma típico a las condiciones establecidas en este trabajo (Buffer de fosfatos, pH 6.5, presión de inyección 1 psi y 5 μ l muestra).

El experimento mostró cambios sobre la forma típica de la línea base, como puede observarse en la Figura 9, y pérdidas del producto 2,4-D adicionado a ambas muestras, esto podría ser explicado en primera instancia por la absorción del 2,4-D al filtro; el agua de consumo tuvo una reducción, en absorbancia, cercana al 20% en comparación del estándar. La muestra tomada del Río Pesquería mostró una pérdida en la lectura de casi un 50% con respecto al estándar, esto pudo ser ocasionado por la absorción del filtro, junto a la adhesión del 2,4-D a partículas de arcilla y otros coloides suspendidos en la muestra (Bakhtiary *et al.*, 2013).

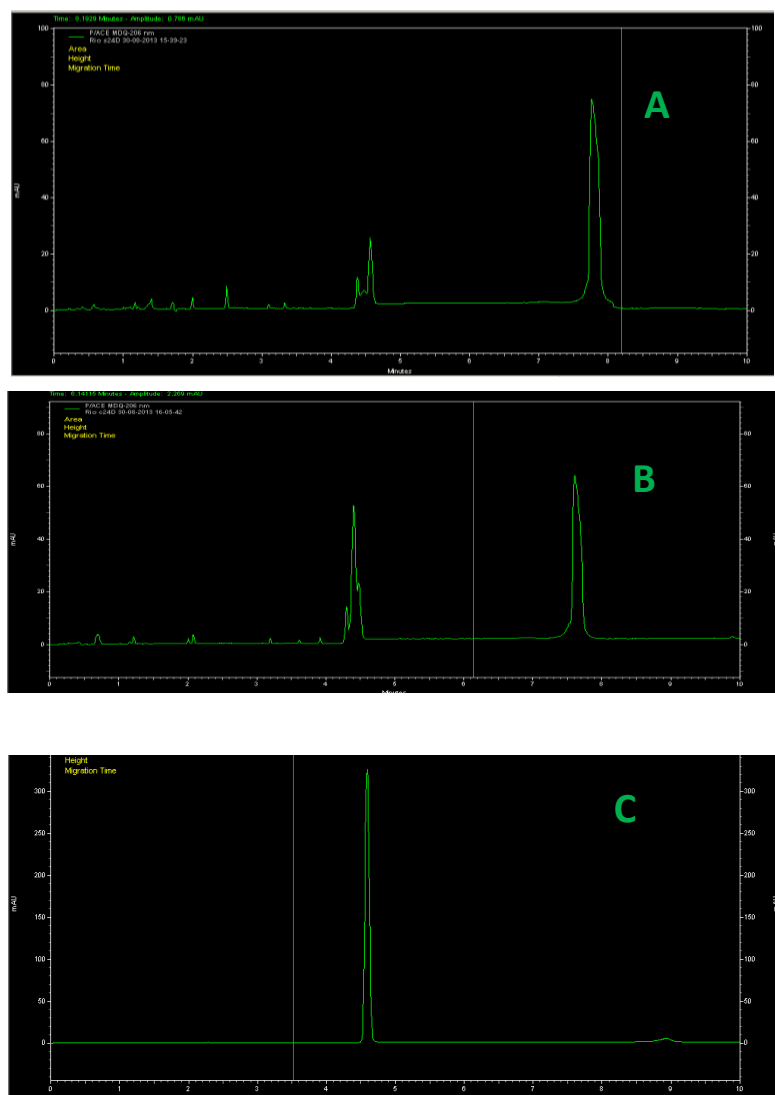


Figura 9. Electroferogramas obtenidos con muestras del Río Pesquería (“A” sin 2,4-D; “B” con 2,4-D) y electroferograma “C” con agua Mili Q (para los tres casos se usó la metodología establecida en este trabajo).

5. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de trabajo propuestas para esta investigación, fue posible desarrollar una metodología capaz de cuantificar 2,4-D a concentraciones entre 0.1 – 20 mg L⁻¹ utilizando Electroforesis Capilar en Zona. La metodología propuesta en este trabajo permitió obtener buena reproducibilidad y resolución en los electroferogramas, mostrando además mayor rapidez que la reportada previamente en la literatura.

El límite de detección obtenido fue de 9.32 mg L⁻¹, muy por encima de los resultados observados por otros investigadores. Conjuntamente, las condiciones de trabajo propuestas no permitieron observar electroferogramas bien definidos o sin alteraciones provocadas por compuestos químicos presentes en las muestras ambientales de agua, por lo que será necesario incorporar un proceso de extracción, purificación y concentración del 2,4-D, previo al uso de esta metodología en muestras ambientales de agua y suelo.

Estandarizar la técnica de Electroforesis Capilar en Zona tuvo como principal problemática conseguir la estabilidad en la corriente aplicada al medio, ya que no fue posible observar un electroferograma definido hasta lograr dicho objetivo. El tipo y concentración de los buffers de corrida deben ser definidos desde el inicio de trabajo para lograr resultados aceptables con esta técnica, ya que dependerá del buffer seleccionado la capacidad de separación de los compuestos a estudiar, la estabilidad de corriente y la definición del electroferograma.

6. RECOMENDACIONES

Debido al alto nivel de detección (9.32 mg L^{-1}), en contraste a los reportados previamente en la literatura, se vuelve necesario buscar una alternativa para la extracción del compuesto o su concentración, con la finalidad de favorecer la disminución en el límite de detección de la técnica y de ese modo lograr analizar muestras de agua y suelo a concentraciones de micro o nanogramos por litro, comúnmente encontradas en el ambiente, permitiendo además, evitar interferencia provocada por otros compuestos presentes en la muestra.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander BH, JS Mandel, BA Baker, CJ Burns, MJ Bartels, JF Acquavella, C Gustin (2007). Biomonitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid exposure and dose in farm families. *Environ Health Persp.*, **115** (3), 380-376., doi:10.1289/ehp.8869. <http://dx.doi.org/>.
- Álvarez-Benedí J, Bolado S, Muñoz-Carpena R, Alonso-Rodríguez E, Marinero P y García-Sinovas D (2007). Modelización de la variabilidad en las isothermas de adsorción de metilimazametabenz en suelos. *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo.*, **8**, 195-201.
- Al-Waili, N., K. Salom, A. Al-Ghamdi, y M. J. Ansari (2012). Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *The Sci World J.*, doi:10.1100/2012/930849.
- Andino María G, Profeta Mariela I, Romero Jorge M y Jorge Nelly L. (2010). Espectroscopia UV - IR del 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético). *UNNE - Secretaría General de Ciencia y Técnica*. (W3400BCH) Corrientes - Argentina - Tel./Fax: +54 (03783) 427181.
- Anwar M P, A S Juraimi, B Samedani, A Puteh, A Man (2012). Critical period of weed control in aerobic rice. *The Sci World J.*, doi: 10.1100/2012/603043.
- Asami T y H Imura (2006). Absolute Determination method for trace quantities of enantiomer of glufosinate by γ -Cyclodextrin modified capillary zone

- electrophoresis combined with solid-phase extraction and on-capillary concentration. *Anal Sci.*, **22**, 1489-1493.
- Backer DR. (1995) Capillary Electrophoresis. Ed *Wiley-Intersciences publication*. ISBN 0-471-11763-3.
- Bakhtiary S, Shirvani M y Shariatmadari H (2013). Adsorption–desorption behavior of 2,4-D on NCP-modified bentonite and zeolite: Implications for slow-release herbicide formulations. *Chemosphere.*, **90**, 699–705.
- Beckie HJ y Tardif FJ (2012). Herbicide croos resistance in weed. *Crop Prot.*, **35**, 15–28.
- Chiang YJ, YX Wu, MY Chiang, CY Wang. (2008) Role of Antioxidative System in Paraquat Resistance of Tall Fleabane (*Conyza sumatrensis*). *Weed Sci.*, **56**, 350–355.
- De Roos AJ, A Blair, JA Rusiecki, JA Hoppin, M Svec, M Dosemeci, DP Sandler, MC Alavanja (2005). Cancer incidence among Glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ Health Persp.*, **113**, 49–54.
- Esqueda-Esquivel VA y OH Tosquy-Valle. (2006) Control químico y mecánico de maleza en soya de temporal. *Agri Téc en Méx.*, **32** (3), 353-358.
- Farenhorst A y B Prokopowich (2003). The effect of propnil co-application on 2,4-D sorption by soil. *J of Environ Sci and Health B.*, **38** (6), 713–721.
- Fonseca AP, Lima DLD and Valdemar IE. (2011) Dregadation by Solar Radiation of Estrogenic Hormones Monitored by UV-Visble Spectroscopy and Capillary

Electrophoresis. *Water Air and Soil Poll.*, **215**, 441-447 doi: 10.1007/s11270-0100489-7.

Forray FI y DK Hallbauer (2000). A study of the pollution of the Aries River (Romania) using capillary electrophoresis as analytical technique. *Environ Geo.*, **39** (12), 132-1384.

Fu F, LX Xiao, W Wang, XQ Xu, LJ Xu, GM Qi, GN Chen. (2008) Study on the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic sodium (MCPA sodium) in natural agriculture-soils of Fuzhou, China using capillary electrophoresis. *Sci. of the T Environ.*, **407**, 1998-2003. doi:[10.1016/j.scitotenv.2008.11.023](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.023).

González-Márquez LC y Hansen AM (2009). Adsorción y mineralización de atrazina y relación con parámetros de suelos del DR 063 Guasave, Sinaloa. *Rev Mex de C Geo.*, **26** (3), 587-599.

Griffin JL, DK Miller, JM Ellis, and PA Clay. (2004). Sugarcane Tolerance and Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) Control with Paraquat. *Weed Tech.*, **18**, 555–559.

Hernández-Antonio A y AM Hansen. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, **27** (2), 115-127.

INEGI (1986). Síntesis Geográfica de Nuevo León. INEGI. México D. F. 27 y 28.

- INEGI (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Pesquería, Nuevo León. Clave Geoestadística 19041. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/19/19041.pdf>
- Kashyap SM, Pandya GH, Kondawar VK and Gabhane SS. (2005) Rapid Analysis of 2,4-D in Soil Samples by Modified Soxhlet Apparatus Using HPLC with UV Detection. *J of Chromatogr Sci.*, **43**, 81-86.
- Kobylecka J, A Turek, L Sieron (2009). Phenoxyalkanoic acid complex Part II. Complexes of selected bivalent metals with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,(2,4.dichlorophenoxy)propionic acid (2,4DP). *Thermochimica Acta.*, **482**, 49-59., doi:[10.1016/j.tca.2008.10.005](https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.10.005).
- Kruaysawat, J., P. J. Marriott, J. Hughes y C. Trenerry. 2001. Separation of chlorophenoxyacetic acids and chlorophenols by using capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis.*, **22** (11), pp. 2179–85.
- Lanaro R, Costa J L, Fernandes L C R, Resende R R, and Tavares M F M. (2011) detection of paraquat in oral fluid, plasma, and urine by capillary electrophoresis for diagnosis of acute poisoning. *J of Anal Toxicology.*, **35**, 274-279.
- Lins VS, Santos HR, and Goncalves MC. (2007) The Effect of the Glyphosate, 2,4-D, Atrazine e Nicosulfuron Herbicides upon the Edaphic Collembola (Arthropoda: Ellipura) in a No-Tillage System. *Neotropical Entomolgy.*, **36** (2), 261-267.

- Lucio M and Schmitt-Kopplin P. (2006) Modelling the binding of triazine herbicides to humic substances using capillary electrophoresis. *Environ Chem Lett.* **4**, 15-21., doi:10.1007/s10311-005-0017-y.
- Mamadou A, A Haougui, BM Coulibaly, A Moumouni, O Garba. (2010) An assessment of the impact of glyphosate and 2,4-D amine salt on weeds in Niger. *Asian J of Agr Sci.*, **2** (4), 150-157.
- Martínez MI y M Cruz. (2009) El uso de químicos veterinarios y agrícolas en la zona ganadera de Xico, centro de Veracruz, México y el posible impacto ambiental. *Acta Zoo Mex.* **25** (3), 673-681.
- Nakbi, A, W Tayeb, S Dabbou, M Issaoui, A K Grissa, N Attia y M Hammami. 2010a. Dietary olive oil effect on antioxidant status and fatty acid profile in the erythrocyte of 2,4-D- exposed rats. *Lipids in Health and Disease.*, **9** (89), 1–10. <http://www.lipidworld.com/content/9/1/89>.
- Nakbi, A, W Tayeb, A Grissa, M Issaoui, I Chargui, M Ellouz, A Miled y M Hammami. 2010b. Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutr & Metab.*, **7** (1), 80 1-11. <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/7/1/80>.
- Ormeño J (1992). Efecto de la avenilla (*Avena fatua* L.) sobre la producción de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Agri Tec.*, **52** (1), 25 – 31.

- Qin W, H Wei, and SFY Li. (2002) Determination of Acidic Herbicides in SurfaceWater by Solid-Phase Extraction Followed by Capillary Zone Electrophoresis. *J of Chromatogr Sci.*, **40**, 387-391.
- Rodríguez-Cruz MS, Andrades MS, Sánchez-Martín MJ, Sánchez-Camazano M (2003). Efecto de la aplicación de lodos de aguas residuales al suelo en la persistencia del herbicida linuron en condiciones de campo. *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo.*, **6**, 349-354.
- Rosales-Robles E y R Sanchez-de la Cruz (2006). Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de acción. *Folleto Técnico No. 35. INIFAP*. ISBN: 968-800-666-1.
- Salem AA. (2007) analysis of some chlorophenoxy acids and carbamate herbicides in water and soil as amide derivatives using Gas Cromatography-Mass Spectrometry. *J of Chromatogr Sci.*, **45**, 131-139.
- Scrano L, Bufo SA, Menzinger F, and Schitt-Kopplin P. (2006) Novel degradation products of the herbicide oxasulfuron identified by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Environ Chem Lett.*, **4**, 225-228.
- Shi Y, Y Bai, Y Zou, B Cai, F Liu, P Fu y L Wang (2012). The value of plasma paraquat concentration in predicting therapeutic effects of haemoperfusion in patients with acute paraquat poisoning. *PLoS ONE.*, **7** (7): e40911. doi:10.1371/journal.pone.0040911.

- Song X and Budde WL. (1996) Capillary electrophoresis-Electrospray Mass Spectra of the herbicides paraquat and diquat. *J Am Soc Mass Spectrom.*, **7**, 981-986.
- Tarragó JR, F Fernández, MJ Marinich, L Lilles (2005). Estudio comparative de la volatilidad de dos formulaciones de 2,4-D (ácido 2,4-diclorfenoxiacético). Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencia Agropecuarias (UNNE). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Resumen: A-019. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/5-Agrarias/A-019.pdf>
- Walsh M J, N Maguire y S B Powles. (2008) Combined effects of wheat competition and 2,4-D amine on phenoxy herbicide resistant *Raphanus raphanistrum* populations. *Weed Research.*, **49**, 316-325., doi: 10.1111/j.1365-3180.2008.00689.x.
- Xu W, Gao P, Zhang X, y Song L (2008). Evaluation of Ceftazidime contents in antibiotic discs by capillary electrophoresis. *New Microb.*, **31**, 377-381.
- Zhang X, S Acevedo, Y Chao, Z Chen, T Dinoff, J Driver, J Ross, R Williams, R Krieger (2011). Concurrent 2,4-D and triclopyr biomonitoring of backpack applicators, mixer/loader and field supervisor in forestry. *J of Environ Sci and Health Part B.*, doi: 10.1080/03601234.2011.559424.

8. ANEXOS

8.1. Resumen presentado en el II Congreso de Investigación en Ciencia y Tecnología Agropecuaria

Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología Agropecuaria A.C.
Instituto Tecnológico de Roque

CUANTIFICACIÓN DE 2,4-D UTILIZANDO ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA CON UN DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS

Armando C Bautista Carrillo¹; Juan A Vidales Contreras¹; Humberto Rodríguez Fuentes¹; José E Treviño Ramírez¹; Víctor E Aguirre Arzola¹; Juan F Hernández Chávez².

¹Subdirección de Estudios de Posgrado, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Campus de Ciencias Agropecuarias, ubicada en: Calle Francisco Villa s/n, Colonia Exhacienda el Canadá, con código postal 66050 en Gral. Escobedo, Nuevo León. ²Instituto Tecnológico de Sonora, ubicado en Ciudad Obregón, Sonora. Contacto: bta_csr@hotmail.com

RESUMEN

El herbicida 2,4-D ha sido utilizado desde los años 40's en las explotaciones agrícolas; sin embargo, este compuesto posee efectos nocivos sobre la salud humana, por lo cual la búsqueda continua de metodologías capaces cuantificar residuos en diferentes muestras ambientales ha sido un gran campo de estudio en las últimas décadas; particularmente las técnicas de HPLC y CG han logrado esta función, pese a esto, resultan tener altos costos, por lo cual la Electroforesis Capilar (EC) es una opción importante para la cuantificación de residuos en baja concentración, ya que tiene un bajo costo, menor consumo de buffer y solventes, con alta sensibilidad y reproducibilidad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue "Establecer una metodología cuantitativa basada en Electroforesis Capilar en Zona para la cuantificación 2,4-D". Para esto se utilizó un equipo Beckman Coulter P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis con arreglo de diodos, utilizando un buffer de fosfatos a pH 6.5 con 15kV y un capilar de boro-silicato con una longitud de 50 cm a la ventana de detección. Con esta metodología se alcanzó un límite de detección de 9.32 mg L⁻¹, con una R²=0.99. Es posible concluir que la técnica es adecuada para la cuantificación de 2,4-D; sin embargo, deben acoplarse metodologías para la concentración y extracción del 2,4-D, y así disminuir los límites de detección para el compuesto.

Figura 10. Resumen del trabajo presentado, en formato oral, en el marco del II Congreso de Investigación en Ciencia y Tecnología Agropecuaria, con sede en el Instituto Tecnológico Roque, Celaya, Gto del 12 – 14 mayo de 2014.